



PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — *Étude au microscope électronique à balayage du développement d'Aspergillus niger Van Tieghem sur milieu solide. Note (*) de Marie-Anna Aueuvre et Maurice Raimbault, présentée par Léon Hirth.*

La présente étude concerne les aspects microscopiques (M.E.B.) de l'enrichissement en protéine de substrats amyliques solides sous forme de granules ou de paillettes par culture du Champignon *Aspergillus niger*. Les relations substrat-mycélium ainsi que les différentes phases du développement de ce Champignon sur deux substrats amyliques sont décrites : spores formant l'inoculum, germination, ramifications et croissance exponentielle conduisant au recouvrement total des granules jusqu'au cœur du substrat, et à la prise en masse du milieu par le mycélium, ce qui aboutit à une teneur finale du milieu en protéines de 17% au lieu des 2 à 4% initiaux (suivant les substrats), soit un enrichissement moyen de 13%.

PLANT PHYSIOLOGY. — Scanning Electron Microscopy Study of Development of *Aspergillus niger* Van Tieghem on a Solid Substrate.

The present Note concerns a scanning electron microscopical study of the protein enrichment of solid starchy substrates due to fermentation by the fungus *Aspergillus niger*. Relations between substrate and mycelium, as well as the different phases of development of the fungus on two starchy substrates are described: inoculum forming spores, germination, branching and exponential growth leading to the covering of granules up to the center of the substrate and finally to the total and homogeneous invasion of the substrate by mycelium.

INTRODUCTION. — Dans le cadre d'études sur l'enrichissement en protéines de substrats amyliques (alimentation animale), la fermentation d'un substrat granuleux à l'aide du Champignon *Aspergillus niger* s'est révélée très prometteuse [1]. En fin de croissance du Champignon le substrat contient 17% de protéines (par rapport à son poids sec initial) soit un enrichissement moyen de 13%, l'apport en protéines étant constitué par le mycélium du Champignon. Dans cette étude nous nous sommes plus particulièrement penchés sur l'aspect microscopique de cette culture en étudiant en microscopie électronique à balayage (M.E.B.) le développement de cette moisissure et en particulier les relations substrat-mycélium et l'influence de ce type de culture sur le Champignon.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Le Champignon est cultivé suivant la technique de Raimbault et Alazard [1], en colonnes aérées, sur un substrat granuleux stérile contenant, pour 100 g de farine sèche : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 11,25 g; urée : 1,7 g; KH_2PO_4 : 5 g; eau du robinet, 100 ml; pH final : 4,5; humidité finale, 50% pour le Manioc et 60% pour la Pomme de terre; inoculation avec $2 \cdot 10^9$ spores. En culture courante, il est inutile de stériliser les substrats, les bas pH atteints au cours de la croissance inhibant le développement bactérien [2].

Les deux substrats amyliques utilisés, farine de Manioc et paillettes de Pomme de terre déshydratées, diffèrent par leur teneur en amidon, par l'accessibilité de cet amidon, variable en raison des modes de préparations différentes, par la présence et la proportion de substances végétales résiduelles non amyliques et enfin par la morphologie des granules élémentaires les composant.

La métallisation sous vide des spécimens biologiques fragiles pouvant entraîner des distorsions de surfaces importantes, il est nécessaire de protéger celles-ci. Echlin [3] ainsi que Marszalek et Small [4] ont obtenu de bons résultats obtenus soit par une lyophilisation à basse température, précédée ou non d'une fixation chimique, soit par une fixation chimique suivie d'une déshydratation alcoolique. Dans ces conditions les détails d'ornementation des parois et des organes tels que cils ou flagelles sont préservés et accessibles à l'observation. Différents essais sur notre matériel nous ont conduit à adopter un mode de préparation voisin : des fragments inférieurs à 1 mm de côté, prélevés au cœur de la colonne, sont fixés dans le glutaraldéhyde à 4% à pH 7 pendant 1 h, ou à 25% pendant une nuit et déshydratés dans des bains d'éthanol jusqu'à l'alcool absolu. Ils subissent ensuite une double métallisation or-palladium, sous vide.

Les observations ont été conduites à l'aide d'un microscope « Cambridge-Stereoscan S4 », sous une tension de 20 kV.

RÉSULTATS. — 1. *Morphologie des substrats et des spores.* — La farine de Manioc crue se présente sous forme de granules d'amidon, sphériques, lisses, assez hétérogènes quant à leur taille bien que la majorité d'entre eux ait de 7 à 15 μm de diamètre. On observe relativement peu de débris végétaux (fig. 1). Cette farine doit être cuite pour permettre la

13 OCT. 1983

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 3348 ex 1

Cote B

B3348 ex 1

culture du Champignon. Au laboratoire elle subit une cuisson à la vapeur suivie d'une congélation; ce mode de préparation entraîne une modification physico-chimique de l'amidon, ce qui même la déformation des granules, qui apparaissent alors comme des blocs plus ou moins anguleux, aux arêtes arrondies, d'environ 50 à 80 μm de côté. La surface en est granuleuse et accidentée (fig. 2). La farine de Pomme de terre présente des écailles grossières, très anguleuses, de dimensions variables, à la surface plissée et ridée (fig. 5).

EXPLICATION DES PLANCHES

Les photos sont réalisées au Laboratoire d'Écologie générale du Muséum national d'Histoire naturelle, 4, avenue du Petit-Château, 91800 Brunoy, avec l'aide technique de M^{lle} Munsh.

Photos were made at Laboratoire d'Écologie générale du Muséum national d'Histoire naturelle, 4, avenue du Petit-Château, 91800 Brunoy, with technical assistance of Miss Munsh.

Les figures 1, 2, 9, 10, 11 représentent une culture sur Manioc et les figures 4, 5, 6, 7, 8, 12 une culture sur Pomme de terre.

Figures 1, 2, 9, 10, 11 represented Cassava-culture, and figures 4, 5, 6, 7, 8, 12 Potato-culture.

Planche I

Fig. 1. — Granules de farine de Manioc cru (G \times 504).

Fig. 1. — Granule of crude Cassava-flour.

Fig. 2. — Granules hydratés, modifiés par la cuisson, de farine de Manioc cuit (G \times 294).

Fig. 2. — Moistenned granules, changed by cooking, of cooked Cassava-flour.

Fig. 3. — Spores d'*Aspergillus niger* n° 10, récoltées directement de la phialide d'une culture sur milieu gélosé (G \times 3 300).

Fig. 3. — Spores of Aspergillus niger n° 10, from phialide, of an agar-culture.

Fig. 4. — Détail d'une spore hydratée, sur substrat solide, au temps T=0. Noter les côtes radiales (flèche) (G \times 11 000).

Fig. 4. — Detail of moistenned spore, on solid substrate, at time T=0. Note the radials ribs (arrow).

Planche II

Fig. 5. — Particules de farine de Pomme de terre réhydratées, au temps T=0, les spores (flèche) sont disséminées à la surface (G \times 308).

Fig. 5. — Moistenned particules of Potato-flour, at time T=0, ribs (arrow) are scatened on surface.

Fig. 6. — Détail de spores germées : la spore (flèche) apparaît vidée de sa substance, le tube germinatif est unique et mesure ici 21 μm de long (G \times 3 360).

Fig. 6. — Detail of germinated spores: the spore (arrow) appears emptied of its substance, germ tube is alone and measures here 21 μm long.

Fig. 7. — Vue d'ensemble des spores germées dont les filaments mycéliens commencent à recouvrir le substrat, au temps T=16 h (G \times 960).

Fig. 7. — General view of germinated spores, which mycelial filaments begin to cover the substrate at time T=16 h.

Planche III

Fig. 8. — Hyphes se dressant à la verticale (G \times 1 680).

Fig. 8. — Hypha stand up at upright.

Fig. 9. — Hyphes franchissant les espaces intergranulaires (G \times 550).

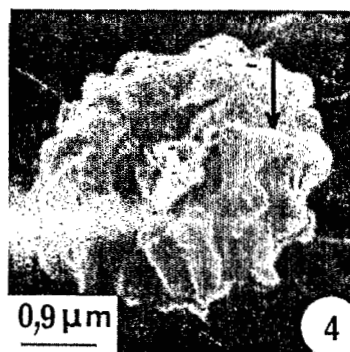
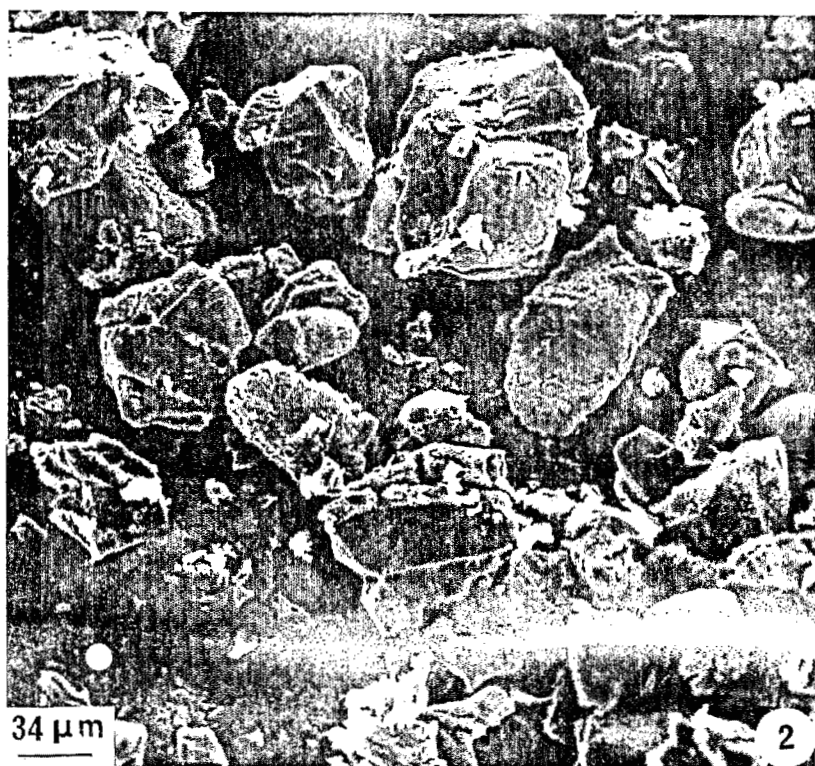
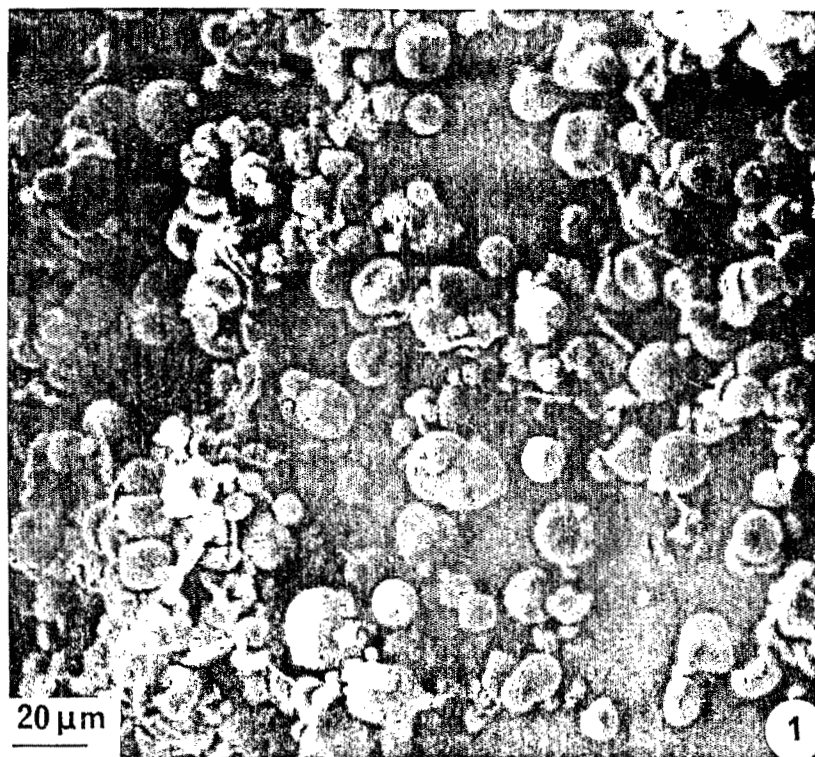
Fig. 9. — Hypha through intergranulates spaces.

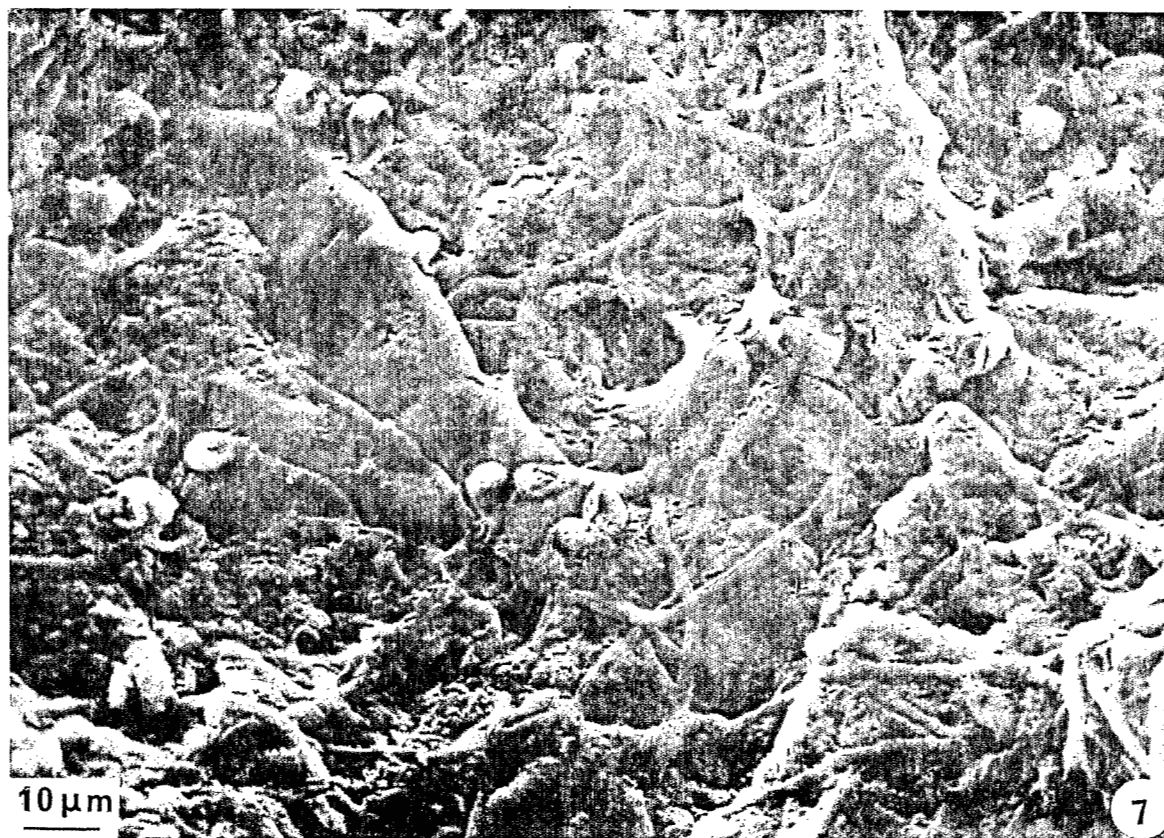
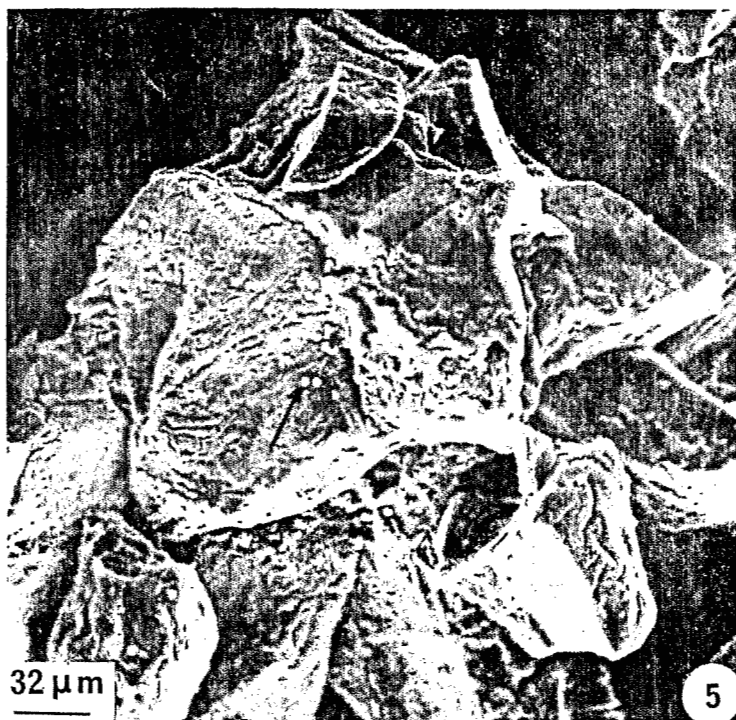
Fig. 10. — Granules recouverts par les filaments qui peuvent s'enrouler en spirale (flèche) (G \times 308).

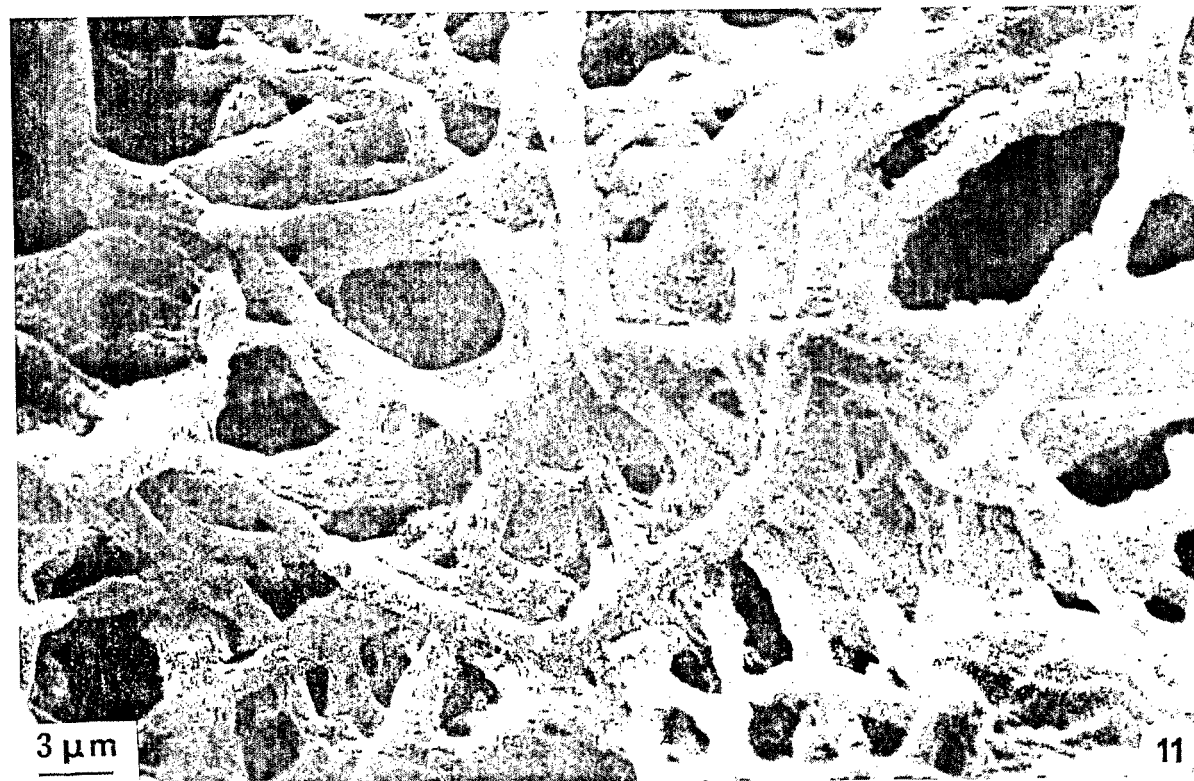
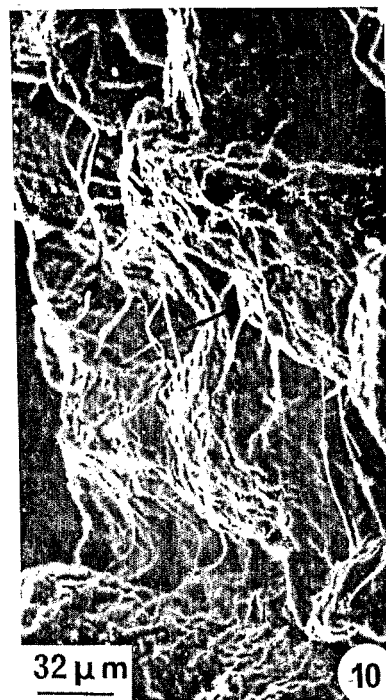
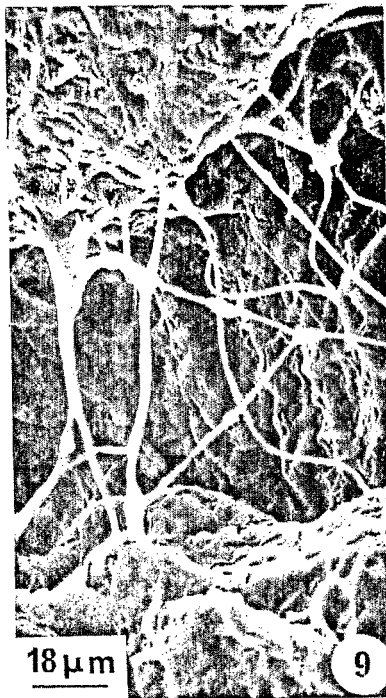
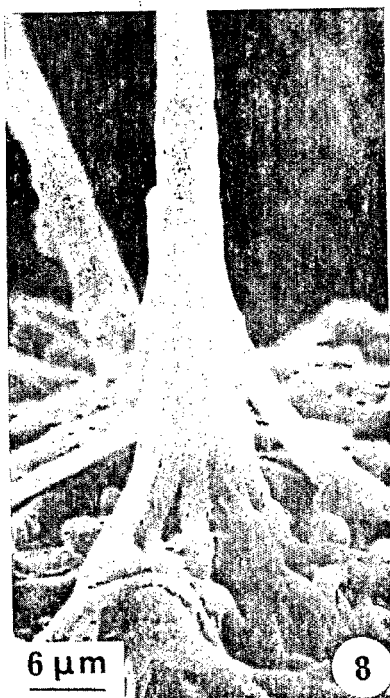
Fig. 10. — Granules covered by filaments, which can roll up in spiral (arrow).

Fig. 11. — Détail de l'entremêlement des hyphes ramifiées (G \times 3 360).

Fig. 11. — Detail of intermighing of branching hypha.







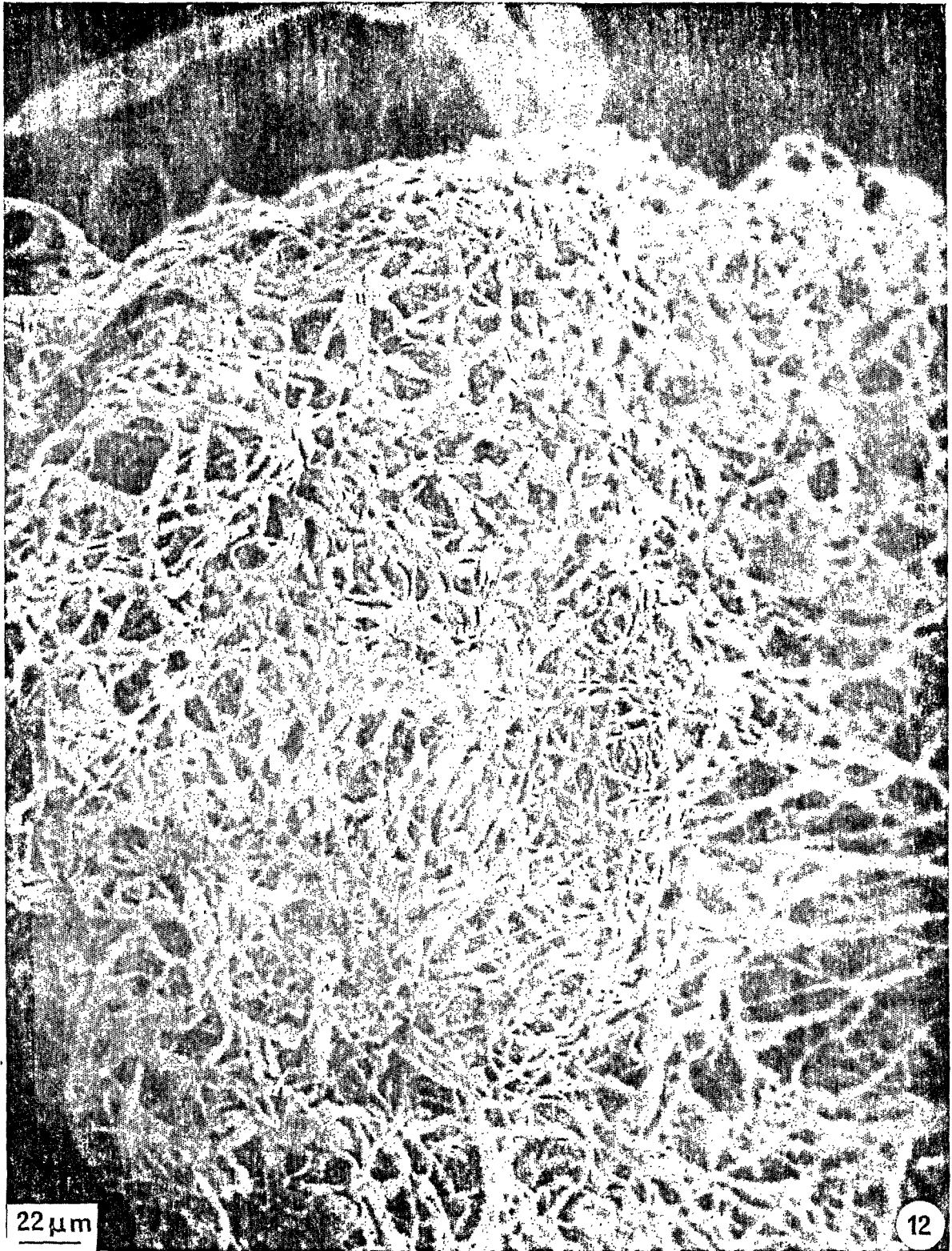


Planche IV

Fig. 12. — Stade final : la structure originelle du substrat disparaît sous l'écheveau mycélien ($G \times 460$).

Fig. 12. — Final phase: original structure disappears under mycelial hank.

Dans ces substrats les irrégularités de surface forment des niches favorables au maintien en place des spores et au développement des hyphes. A l'observation (M.E.B.) les spores à l'état sec ont la forme de cylindres courts et irréguliers de diamètre $4\mu\text{m}$ et de hauteur $2\mu\text{m}$ (soit un volume de $25\mu\text{m}^3$). La figure 3 montre des spores sèches, encore en file, venant directement de la phialide. Les côtes radiales, particulièrement marquées dans le groupe *niger* sont ici nettement visibles. La spore en cours d'hydratation (fig. 4) gonfle pour devenir presque parfaitement sphérique, occupant désormais un volume de $34\mu\text{m}^3$. C'est sous cette forme qu'elle est observée dans les préparations aqueuses en microscopie optique.

2. *Germination et premières ramifications.* — La première étape de la germination est une phase d'activation caractérisée physiologiquement par une intense activité métabolique et morphologiquement par un gonflement notable ([5], [6]). Les spores peuvent atteindre un diamètre de $5\mu\text{m}$ et plus, ce qui correspond à un volume de $65\mu\text{m}^3$, soit environ le double du volume original. Ce gonflement est cependant moins important que sur le milieu gélosé en boîte de Petri où il est fréquent d'obtenir des spores ayant un diamètre de $8\mu\text{m}$, leur volume étant alors multiplié par 10 par rapport à celui de la spore déshydratée. Outre l'effet favorable de l'Agar connu depuis longtemps [7] cette différence est sans doute également due aux conditions de la boîte de Petri : le milieu gélifié a en effet une humidité plus forte (85% contre 50 à 60%), l'atmosphère est saturée en eau et il se produit une légère accumulation en CO_2 du fait du confinement, alors que les colonnes n'ont qu'un faible apport en CO_2 , correspondant au taux de l'air (0,03%).

Cette phase est indépendante des conditions extérieures mais le stade suivant, l'émergence du tube germinatif, peut ne pas se produire si ces conditions deviennent défavorables [8]. Le délai de germination est ici plus long que sur le milieu gélosé et il faut attendre en général 8 h, sur Pomme de terre, pour qu'environ 50% des spores présentent des tubes germinatifs de 6 à $8\mu\text{m}$ de long; dans le même temps, sur Manioc, seules quelques spores montrent une protubérance, futur tube germinatif et il faut attendre 10 h de culture pour que la totalité des spores aient germé; les jeunes hyphes mesurent alors de 6 à $30\mu\text{m}$, ce qui révèle une grande hétérogénéité quant aux temps individuels de germination.

Les spores germées, vidées de leur contenu, un peu comme des ballons dégonflés montrent des crêtes distendues et estompées (flèche, fig. 6). Les tubes germinatifs mesurent en moyenne $3\mu\text{m}$ de diamètre à leur émergence pour s'amenuiser jusqu'à $1,5\mu\text{m}$ à leur extrémité. Il faut remarquer, déjà à ce stade, la couverture du substrat par les jeunes hyphes, couverture qui est fonction de la densité de l'inoculum et des taux de germination sur paillettes de Pomme de terre au temps $T=16\text{ h}$.

La phase suivante est celle de la ramification des hyphes, qui conditionne le développement du Champignon et par conséquent la colonisation du substrat. La première ramification se produit à proximité de la spore, mais seulement après que l'hyphe ait atteint une certaine longueur : on peut observer des hyphes de 16 à $50\mu\text{m}$ encore sans filaments latéraux. La fréquence des ramifications est fonction du taux de croissance, lui-même tributaire du milieu ([9], [10]). En effet à ce stade également, on note des différences entre les deux substrats : 5 h après la germination les hyphes n'ont encore

qu'une ramification secondaire sur Manioc alors qu'elles en présentent plusieurs sur Pomme de terre. La Pomme de terre se révèle donc un meilleur milieu pour la germination et les premiers stades de développement. Krishnan et coll. [11] avaient d'ailleurs déjà noté l'effet stimulant de l'extrait de Pomme de terre sur la germination d'*Aspergillus niger*.

A ce stade les granules du substrat sont encore très individualisés, la structure est lâche, identique à celle du temps zéro : le contenu de la colonne s'éparpille si on l'extrait.

3. *Phase de croissance exponentielle : constitution du réseau mycélien.* — C'est lors de cette phase que le procédé de culture sur milieu solide va démontrer sa supériorité sur les méthodes de cultures traditionnelles. Le mycélium végétatif se ramifie et rampe à la surface des granules (fig. 10). Les ramifications, jointes à la croissance linéaire, aboutissent à une telle densité mycélienne que toute la surface du substrat est recouverte et n'est plus discernable. Il est d'ailleurs mal aisé, en raison de ce chevelu mycélien d'identifier les entrecroisements d'hyphes des ramifications latérales (fig. 11). Le substrat se présentant ici sous forme de volumes et non plus d'un simple plan, les ramifications peuvent s'étendre à tout l'espace. On peut observer plusieurs filaments accolés se dressant à la verticale : les filaments convergent à la base et forment comme les arcs-boutants d'une colonne centrale (fig. 8). Les filaments assemblés forment ainsi un ensemble plus solide et plus rigide et peuvent constituer entre les granules de véritables ponts pouvant atteindre 80 µm de long (fig. 9 et 10). Les hyphes peuvent également s'enrouler pour former des « cordages » spirales (flèche, fig. 10). La combinaison de ces différents éléments conduit à la colonisation rapide de toute la surface disponible et ce dans tous les plans. On obtient ainsi un réseau d'hyphes pénétrant dans les moindres interstices, englobant tous les granules et tissant entre eux un écheveau mycélien jusqu'au cœur de la colonne.

Le résultat final obtenu en 24 h est illustré par la figure 12, qui représente une coupe de colonne et sur laquelle on ne voit plus qu'un enchevêtrement de filaments sous lequel le substrat disparaît complètement. La masse du chevelu mycélien enserrant les granules leur confère une cohérence et une compacité nouvelles : la colonne sortie de son tube de verre forme une « carotte » compacte d'un seul tenant.

Cette masse de mycélium explique les teneurs élevées en protéines du produit final. Les observations ont été arrêtées à ce stade car il correspond au maximum de teneur en protéines du produit fermenté.

(*) Remise le 12 janvier 1981, acceptée après révision le 29 mars 1982.

- [1] M. RAIMBAULT et D. ALAZARD, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 1980, p. 199-209.
- [2] M. A. AUFEUVRE, Rapport interne O.R.S.T.O.M., 1979.
- [3] P. ECHLIN, *J. of the Royal Microscopical Society*, 88, 1968, p. 407-418.
- [4] D. S. MARZALEK et E. B. SMALL, *Scanning Electron Microscopy. Proc. of the 11th Annual Scanning Electron Microscope Symposium*, 1969, II T Res. Inst. Chicago, Illinois 60616.
- [5] D. GOTTLIEB, *The Botanical Review*, XVI, n° 5, 1950, p. 229-257.
- [6] J. G. MANNERS, in *The Fungus Spore*, MF Madelin, 1966, Butterworths, London and Washington DC, p. 165.
- [7] W. J. ROBBINS, *Amer. J. Botany*, 26, 1939, p. 772-778.
- [8] J. G. ANDERSON et J. E. SMITH, *Can. J. Microbiol.*, 18, 1972, p. 289-297.
- [9] D. KATZ, D. GOLDSTEIN et R. F. POSENBERGER, *J. Bacteriol.*, 109, 1972, p. 1097-1100.
- [10] N. F. ROBERTSON, in *The Fungi, an Advanced Treatise*, I, 1965, p. 618.
- [11] P. S. KRISHNAN, VILOI BAJAJ et S. P. DAMLE, *Appl. Microbiol.*, 2, 1954, p. 303-308.